

， -トレハロースおよびスクロース水溶液の蒸発過程の解析

著者	石井 郁子，傘 孝之
雑誌名	日本歯科大学紀要．一般教育系
巻	44
ページ	31-36
発行年	2015-03-30
URL	http://doi.org/10.14983/00000739

α, α -トレハロースおよびスクロース水溶液の 蒸発過程の解析

The analysis of the evaporation process of α, α -trehalose and sucrose aqueous solutions

北里大学 石井 郁子
生命歯学部 傘 孝之

Ikuko ISHII

*Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine,
1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa, 252-0374, JAPAN*

and

Takayuki KARAKASA

*Department of Chemistry, School of Life Dentistry at Tokyo
The Nippon Dental University,
Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8159, JAPAN*

(2015年2月24日受理)

Abstract

The evaporation process of α, α -trehalose and sucrose aqueous solutions were investigated by FT-IR ATR spectroscopy. The hydration number of α, α -trehalose and sucrose were measured by the temporal molar ratio (water/trehalose and water/sucrose) change and the temporal wavenumber shifts of glycosidic linkage.

Key words : trehalose, sucrose, hydration, FT-IR, ATR, evaporation

以前から、乾燥保護、デンプン老化抑制、タンパク質変性抑制などを示す高機能オリゴ糖である α, α -トレハロース(Fig. 1) (トレハロース)¹⁾の機能を明らかにする目的で水溶液中でのトレハロースの構造を検討してきた。²⁾

その一環として、小液滴(10 μ L)のトレハロース水溶液の自然乾燥により、アモルファストレハロース二水和物(ガラス状態)が形成されることをFT-IRスペクトルから示した。^{3a)}

更に、前報^{3b)}ではトレハロース水溶液の蒸発過程(過飽和状態まで)をFT-IRスペクトルATR法で10分間隔180分インターバル測定し、各時間の

水/トレハロースのモル比に対するグリコシド結合の逆対称伸縮振動吸収ピーク(グリコシド結合ピーク)の低波数シフトがモル比4.7付近で変化し、この変化がトレハロースの動的水和数と一致していることを報告した。

一方、亀岡等^{4,5,6)}は二糖類飽和水溶液とこの水溶液を希釈した種々の濃度の二糖類水溶液のFT-IRスペクトル(グリコシド結合ピークのシフト)の解析から、糖の構造および糖分子と水の相互作用が赤外分光特性に及ぼす影響を把握可能であると報告した。

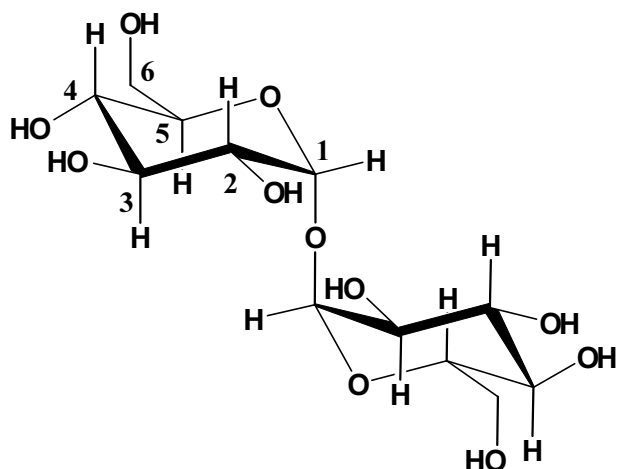


Fig. 1 α,α -trehalose (α -D-glucopyranosyl-(1,1)- α -D-glucopyranoside)(I)

今回、前報^{3b)}で報告したトレハロース水溶液の蒸発法よりも詳細に水／トレハロースのモル比が測定できる実験法を開発し、本方法でトレハロースおよびスクロース水溶液の蒸発を行い、これらのモル比、グリコシド結合ピーク、吸光度の時間変化からトレハロースおよびスクロースの水和構造について解析を行った。

実験

トレハロース二水和物は東京化成の特級試薬、水は関東化学のHPLC用蒸留水を使用した。

IR スペクトル測定には、日本分光製 FT/IR-4200 に、同じく日本分光製 1 回反射型 ATR-PRO450-S にダイヤモンドプリズムを取り付け、分解能 2 cm^{-1} 、積算回数 128 回で測定した。IR スペクトルの処理は、スペクトルマネージャ（日本分光製）を用いた。屈折率は、アタゴ社製ポケット屈折計 PAL-RI で測定した。温度と湿度は、佐藤商事社製 温湿度・露点計 HT-SD データロガーを使用し、10 分間隔で測定した。

1. 標準トレハロース水溶液の調製と検量線の作成

トレハロース二水和物と水から 69 種類のモル比（水／トレハロース = 19.0, 21.0, 23.0, 25.0, 27.0, 29.0, 31.0, 32.9, 35.0, 37.2, 39.3, 41.2, 43.4, 45.3, 47.0, 48.8, 51.0, 51.8, 54.7, 57.1, 59.5, 61.3, 62.7, 65.5, 67.3, 68.7, 71.4, 73.3, 74.6, 75.4, 76.8, 77.7, 83.0, 85.2, 87.0, 89.5, 90.8, 93.1, 94.6, 95.1, 96.1, 101.2, 103.7, 104.7,

106.5, 110.3, 110.7, 112.7, 113.9, 115.1, 117.7, 119.5, 121.8, 124.2, 125.3, 127.5, 129.8, 132.2, 133.8, 136.1, 137.8, 140.0, 141.7, 144.2, 146.0, 147.5, 149.9, 151.7, 153.4) の標準トレハロース水溶液を調製した。

作成した 69 種類のモル比の標準トレハロース水溶液を ATR 法で測定した。得られたスペクトルは Binomial 方式 99 回の反復でスムージング処理し、グリコシド結合ピークと吸光度を測定後、デコンボリューション（半値幅 180）処理し、 $950.252\text{--}1183.6\text{ cm}^{-1}$ (P1)と $1583.75\text{--}1703.8\text{ cm}^{-1}$ (P2)の面積比(P2/P1)を算出した。この面積比(P2/P1)x とモル比（水／トレハロース）y の間には $R^2 = 0.994$ で $y = 99.47x + 1.2748$ の回帰式が成立した(Fig. 2)。

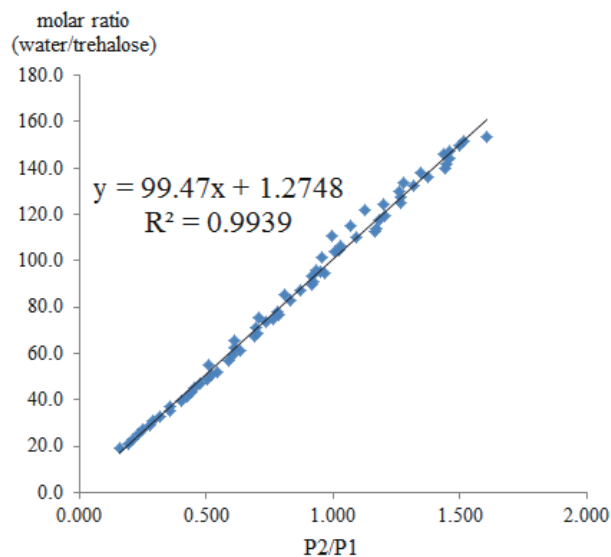


Fig. 2

2. 標準スクロース水溶液の調製と検量線の作成

68 種類のモル比（水／スクロース = 15.3, 16.9, 19.0, 20.8, 23.2, 25.2, 26.9, 29.3, 31.0, 32.9, 35.1, 39.1, 40.7, 43.2, 44.9, 46.9, 49.0, 57.9, 53.4, 54.9, 56.8, 58.9, 60.8, 62.9, 64.9, 66.9, 68.8, 71.0, 72.8, 75.0, 76.8, 78.8, 80.7, 83.0, 84.5, 86.9, 89.1, 91.0, 92.7, 93.9, 97.7, 98.9, 101.1, 104.1, 105.6, 107.5, 109.4, 111.2, 113.4, 115.3, 117.6, 120.1, 121.0, 123.3, 125.5, 127.7, 129.7, 131.0, 133.9, 134.8, 137.4, 139.1, 141.1, 144.9, 146.1, 149.2, 150.5, 152.5) の標準スクロース水溶液を調製した。

作成した 68 種類のモル比の標準スクロース水溶液の FT-IR スペクトルを ATR 法で測定した。得ら

れたスペクトルは Binomial 方式 99 回の反復でスムージング処理し、グリコシド結合ピークと吸光度を測定後、デコンボリューション（半値幅 180）処理し、 $959.412\text{--}1183.6\text{ cm}^{-1}$ (P1)と $1583.75\text{--}1699.94\text{ cm}^{-1}$ (P2)の面積比(P2/P1)を算出した。この面積比 (P2/P1) x とモル比 (水/スクロース) y の間には $R^2 = 0.997$ で $y = 89.948x - 0.166$ の回帰式が成立した (Fig. 3)。

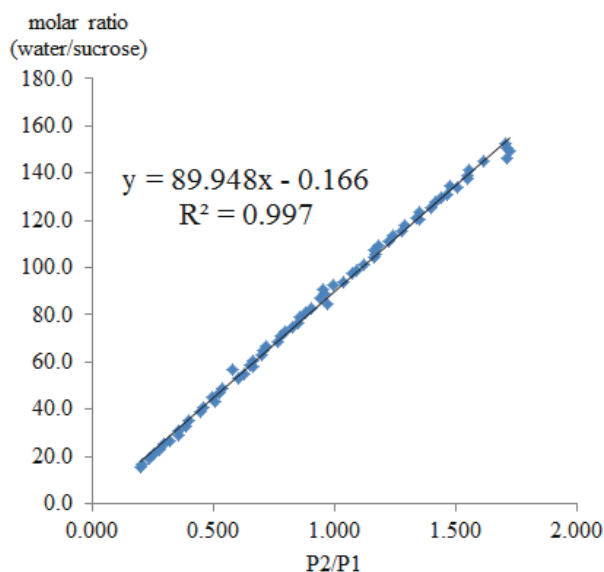


Fig. 3

FT-IRインターバル測定

蒸発調節用蓋：蒸発速度を遅くする目的で日本分光製の液体蒸発防止蓋（約 22 mm^3 ）に付属している密閉用のバイトンリングの大きさに合わせたセロハンリングを作成した。ダイヤモンドプリズム上に糖水溶液を置いた後、このセロハンリングをバイトンリングが接触する ATR 装置の位置に置き、その上に液体蒸発防止蓋をかぶせて測定した。

3.トレハロース水溶液の蒸発

モル比 (水/トレハロース) 127 のトレハロース水溶液をダイヤモンドプリズム上に $3\text{ }\mu\text{L}$ 置き、蒸発調節用蓋をし、室温 4 分間隔で 1364 分までインターバル測定を行った。同時に、試料室の温度と湿度を 10 分間隔で測定した。各経過時間でのモル比 (水/トレハロース) は、スペクトルを Binomial 方式 99 回の反復でスムージング処理し、吸収ピークを測定した後デコンボリューション（半値幅 180）処理を行い、 $950.252\text{--}1183.6\text{ cm}^{-1}$ (P1)と $1583.75\text{--}1703.8\text{ cm}^{-1}$ (P2)の面積比(P2/P1)を算出し、この面積比(P2/P1) x から $y = 99.47x + 1.2748$ の検

量線を使って求めた。

4.スクロース水溶液の蒸発

モル比 (水/スクロース) 120 のスクロース水溶液をダイヤモンドプリズム上に $3\text{ }\mu\text{L}$ 置き、蒸発調節用蓋をし、室温 4 分間隔で 1372 分までインターバル測定を行った。同時に、試料室の温度と湿度を 10 分間隔で測定した。各経過時間でのモル比 (水/トレハロース) は、スペクトルを Binomial 方式 99 回の反復でスムージング処理し、吸収ピークを測定した後デコンボリューション（半値幅 180）処理を行い、 $959.412\text{--}1183.6\text{ cm}^{-1}$ (P1)と $1583.75\text{--}1699.94\text{ cm}^{-1}$ (P2)の面積比(P2/P1) x から $y = 89.948x - 0.166$ の検量線を使って求めた。

5.トレハロースとスクロース水溶液の屈折率

標準トレハロース水溶液と標準スクロース水溶液の屈折率を測定した。トレハロース水溶液についてはモル比 (水/トレハロース = 9.0, 12.0, 12.9, 14.9, 17.0) の屈折率（屈折率計にモル比 19.0 の水溶液を置き、蒸発させ相当するモル比になった時点で測定）も測定した。

結果と考察

前報^{3b)}のトレハロース水溶液蒸発法は、ATR 上に滴下した小液滴の蒸発速度が FT-IR スペクトルに必要な測定時間（分解能 2 cm^{-1} 、積算回数 128 回）約 4 分に対してかなり速く、詳細な濃度変化を測定することが困難であった。今回、日本分光製の液体蒸発防止蓋に付属している密閉用のバイトンリングにセロハンで作ったリングを挟むことで蒸発速度が調節できることを見出した。

本方法でモル比 (水/トレハロース) 127 のトレハロース水溶液 $3\text{ }\mu\text{L}$ の蒸発過程を、FT-IR スペクトルを 4 分間隔のインターバル測定で 1364 分（342 点）測定した。同時に試料室の温度・湿度を 10 分間隔で測定した。この蒸発時間に対する、水/トレハロースのモル比、グリコシド結合の吸収ピーク（データ間隔 0.48 cm^{-1} ）と吸光度、試料室の温度と湿度のグラフを Fig. 4 に示した。Fig. 4 から水/トレハロースのモル比、グリコシド結合の吸収ピークと吸光度は、蒸発時間に対して主に次の 3 段階になっていることが分かる。

段階 1：0 ～ 200 分の 200 分間

モル比：127 から 45 付近まで 82 減少

グリコシド結合ピーク： 992.7 から 991.7 cm^{-1} に 1 cm^{-1} 低波数シフト

吸光度：0.10 から 0.20 に 0.10 増加
 段階 2：200 ～ 650 分の 450 分間
 モル比：45 から 40 付近まで 5 減少
 グリコシド結合ピーク：991.2 cm^{-1} で一定
 吸光度：0.20 から 0.25 に 0.05 増加
 段階 3：650 ～ 1100 分の 450 分間
 モル比：40 から 6 付近まで 34 減少
 グリコシド結合ピーク：991.2 から 983.0 cm^{-1}
 に 8.2 cm^{-1} 低波数シフト
 吸光度：0.25 から 0.86 に 0.61 増加

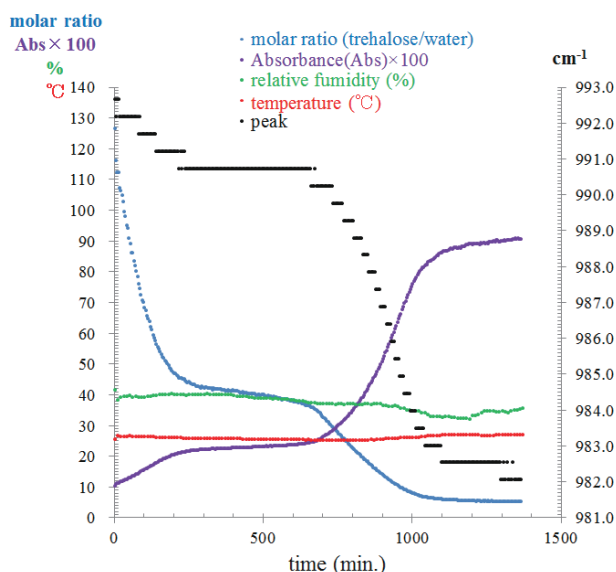


Fig. 4

以上の事実から、段階 1 は、液体蒸発防止蓋内の空間（約 22 mm^3 ）の蒸気圧がトレハロース水溶液と準平衡状態（セロハンリングを通してゆっくりと空気の入りが可能）になるまで自由水が蒸発している状態。

段階 2 は、自由水が蒸発した後、トレハロースの水和殻を構成している水分子がゆっくりと蒸発している状態。

段階 3 は、水和殻を構成する必要最小限の水分子が蒸発して、水和殻が崩壊し、水和殻を構成していた水分子が急速に蒸発した後、トレハロースの水酸基に水素結合をしている水分子（約 6 個）が残ると推定できる。言い換えると、水和殻を構成する水分子の数はトレハロースの水酸基に直接水素結合をしている水分子を含めて 40 から 45 個といえる。

そこで、同じ非還元二糖であるスクロースについてトレハロースと同様に蒸発の実験を行った。

モル比（水／スクロース）120 のスクロース水溶液 3 μL の蒸発過程を、FT-IR スペクトルを 4 分間隔のインターバル測定で 1372 分（344 点）測定した。同時に試料室の温度・湿度を 10 分間隔で測定した。この蒸発時間に対する、水／スクロースのモル比、グリコシド結合の吸収ピーク（データ間隔 0.48 cm^{-1} ）と吸光度、試料室の温度と湿度のグラフを Fig. 5 に示した。Fig. 5 から水／スクロースのモル比、グリコシド結合の吸収ピークと吸光度は、トレハロースの場合と同様に蒸発時間に対しては、次の 3 段階になっていた。

段階 1：0 ～ 208 分の 208 分間

モル比：120 から 32 付近まで 88 減少

グリコシド結合ピーク：995.6 から 994.1 cm^{-1}
 に 1.5 cm^{-1} 低波数シフト

吸光度：0.08 から 0.15 に 0.07 増加

段階 2：212 ～ 444 分の 232 分間

モル比：33 から 25 付近まで 8 減少

グリコシド結合ピーク：993.6 cm^{-1} で一定

吸光度：0.15 から 0.18 に 0.03 増加

段階 3：448 ～ 900 分の 452 分間

モル比：24 から 0 付近まで 24 減少

グリコシド結合ピーク：993.2 から 984.5 cm^{-1}
 に 8.7 cm^{-1} 低波数シフト

吸光度：0.18 から 0.71 に 0.53 増加

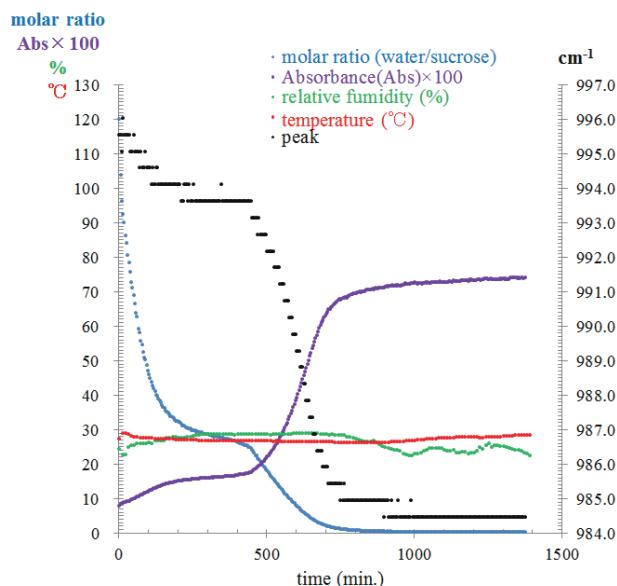


Fig. 5

従って、段階 1 は、セロハンリングを通してゆっくりと空気の入りができる液体蒸発防止蓋内の

空間（約 22 mm³）と準平衡状態になるまで自由水が蒸発している状態。

段階 2 は、残った自由水が蒸発した後、スクロースの水和殻を構成している水分子がゆっくりと蒸発している状態。

段階 3 は、水和殻が崩壊してスクロースの水酸基に水素結合をしている水分子を含めて蒸発した。そして、水和殻を構成する水分子の数はスクロースの水酸基に直接水素結合をしている水分子を含めて 25 から 30 個といえる。

以上の結果は、蒸発時間に対するモル比、グリコシド結合ピーク、吸光度の変化量から、トレハロースおよびスクロースの水和構造の情報が得られる事を示している。

次に、モル比に対するグリコシド結合ピークおよび吸光度の関係（蒸発時間軸を考慮しない）から、トレハロースとスクロースの水和構造について検討した。通常、ATR スペクトルの吸収バンド位置は屈折率に依存し、信号強度は波数に依存している。⁷⁾

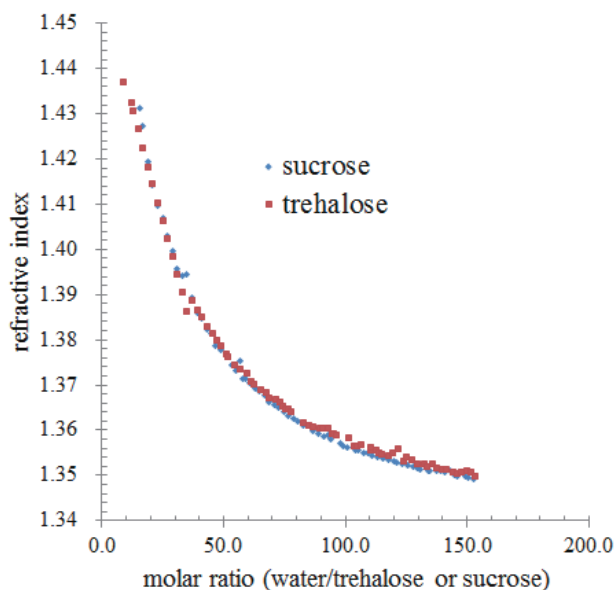


Fig. 6

まず、濃度の逆数のモル比（水／トレハロース、水／スクロース）に対する屈折率を標準トレハロース水溶液と標準スクロース水溶液について測定し、Fig. 6 に示した。トレハロース水溶液の蒸発でのモル比に対する吸光度とグリコシド結合ピーク（右 Y 軸は反転）を Fig. 7 に示した。スクロース水溶液の蒸発でのモル比に対する吸光度とグリコシド結合ピーク（右 Y 軸は反転）を Fig. 8 に示

した。また、標準トレハロース水溶液でのモル比に対する吸光度とグリコシド結合ピーク（右 Y 軸は反転）を Fig. 9 に示した。標準スクロース水溶液でのモル比に対する吸光度とグリコシド結合ピーク（右 Y 軸は反転）を Fig. 10 に示した。

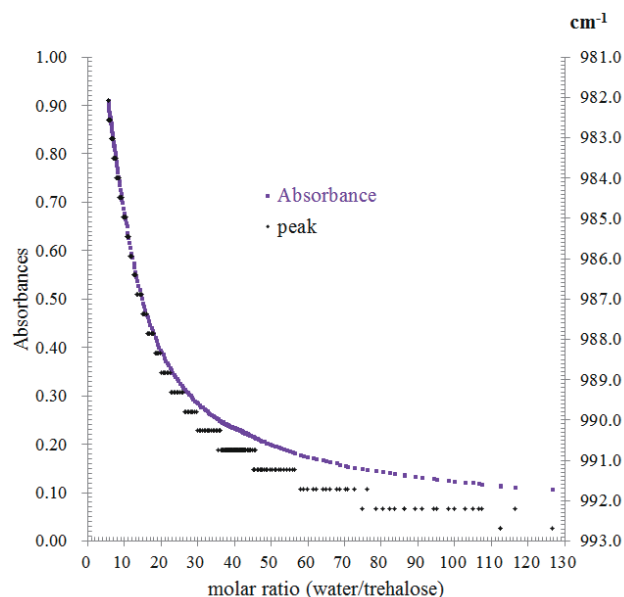


Fig. 7

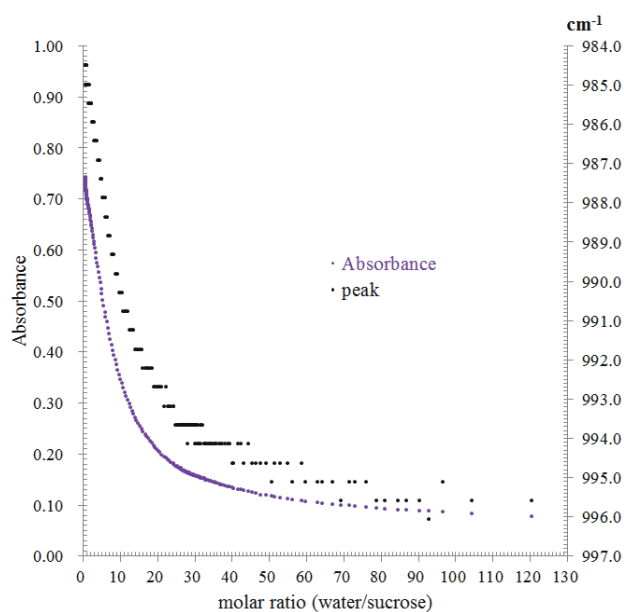


Fig. 8

ATR 測定での濃度に対する吸光度とグリコシド結合ピークの変化は、屈折率⁷⁾と溶媒効果^{4,5,6)}の寄与⁸⁾によるものと考えられる。Fig. 6 に示したモル比（水／トレハロース、水／スクロース）に対す

る屈折率の変化は、トレハロースもスクロースもモル比が小さくなると屈折率が急激に大きくなっている。

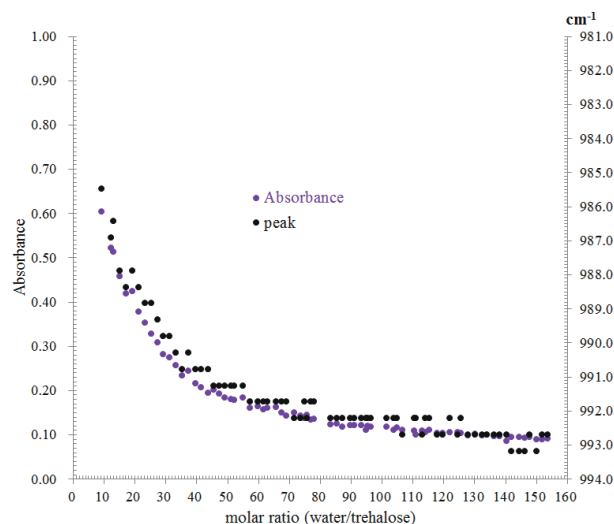


Fig. 9

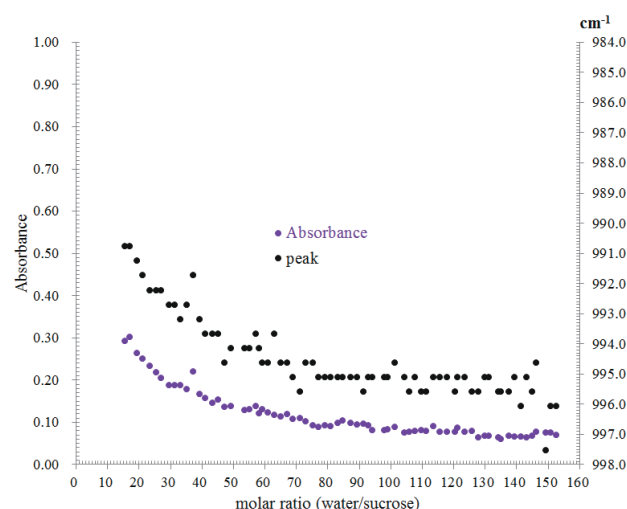


Fig. 10

一方、モル比に対する吸光度は、トレハロース水溶液 (Fig. 7)、スクロース水溶液 (Fig. 8)、標準トレハロース水溶液 (Fig. 9)、標準スクロース水溶液 (Fig. 10) とともにモル比が小さくなると吸光度が急激に大きくなっている。この傾向は、モル比 (水/トレハロース, 水/スクロース) に対する屈折率 (Fig. 6) のグラフと類似している。

また、モル比に対するグリコシド結合ピークの変化は、トレハロース水溶液 (Fig. 7)、スクロース水溶液 (Fig. 8)、標準トレハロース水溶液 (Fig.

9)、標準スクロース水溶液 (Fig. 10) とともにモル比が小さくなると急激に低波数シフトしており、モル比 (水/トレハロース, 水/スクロース) に対する屈折率 (Fig. 6) のグラフと類似している。

従って、本方法から得られるモル比に対する吸光度やグリコシド結合ピークのデータのみから屈折率の寄与を考慮してトレハロースおよびスクロースの水和構造の情報を得ることはかなり困難であることが分かった。

他方、最初に示したように蒸発 (Fig. 4, 5) による濃度変化には、蒸発に関する時間軸のデータがあり、この時間軸のデータがトレハロースおよびスクロースの水和構造解析に重要であると推定された。

文献

1. 第1回～第12回トレハロースシンポジウム記録集
2. 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **36**, 33-37 (2007); **38**, 39-43 (2009); **39**, 37-41 (2010); **40**, 35-39 (2011); **41**, 31-36 (2012)
3. a: 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **42**, 11-16 (2013). b: 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **43**, 27-34 (2014)
4. 狩野幹人, 中西健一, 橋本篤, 亀岡孝治, 日本食品科学工学会誌, **50**, 57-62 (2003)
5. Kanou M., Nakanishi K., Hashimoto A., and Kameoka T., *Appl Spectrosc.* **59**, 885-92(2005)
6. Kanou M., Hashimoto A., and Kameoka T.(2014). Infrared spectroscopic analysis of food carbohydrates. In F. J. Moreno & M. L. Sanz (Eds) *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. Wiley-Blackwell, pp.300-319.
7. 落合周吉. “赤外分光測定法－基礎と最新手法 第Ⅱ部 各種測定法 11. 全反射吸収測定法”. 赤外分光測定法－基礎と最新手法. 田隅三生. 株式会社エス・ティ・ジャパン, 2012, p. 84-92.
8. 池羽田晶文, ぶんせき, 250-251(2009).